

Наночастинки хітозану, модифіковані іонами металів

Л.Б. Суходуб*

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМНУ», вул. Пушкінська, 14, Харків, Україна

(Одержано 30.07.2014; опубліковано online 29.11.2014)

Мікроелементи в організмі людини, які наявні в слідових кількостях ("trace elements") відіграють суттєву роль в регуляції клітинних функцій, активуючи або інгібуючи ферментативні процеси. Модифікація неорганічними іонами біоматеріалів для ортопедичних імплантатів з метою ініціації контрольованих реакцій в тканинах, які оточують імплантат, є одним із сучасних підходів у медичному наноматеріалознавстві. В роботі отримані наноструктури на основі хітозану, легованого іонами металів Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , досліджені спектральні і морфологічні характеристики отриманих зразків та їх протимікробні властивості по відношенню до референтних штамів мікроорганізмів *S. Aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. Albicans* ATCC 885653 з метою подальшого використання в якості компонентів при створенні композиційних біоматеріалів медичного призначення.

Ключові слова: Наночастинки, Іони металів, Хітозан, Мікроорганізми, Протимікробні властивості.

PACS numbers: 87.85.J – , 87.64.Bx, 87.64.Ee

1. ВСТУП

При створенні біоматеріалів медичного призначення, в останні десятиліття значної уваги набуває розділ матеріалознавства з використанням біоміметичного хімічного синтезу, який відтворює біологічні принципи будови тканин в лабораторній практиці [1]. Модифікація неорганічними біоактивними іонами матеріалів для ортопедичних імплантатів з метою ініціації контрольованих реакцій в тканинах, які оточують імплантат, є одним із сучасних підходів у медичному наноматеріалознавстві.

Як відомо, багато металів присутні в тканинах в дуже малих концентраціях, але саме вони відіграють суттєву роль в регуляції клітинних функцій, активують або інгібують ферментативні процеси [2, 3]. Металоорганічні сполуки, до складу яких входять перехідні елементи (Ag , Zn , Cu , Ti , Co , V , Cr), відіграють важливу роль в синтезі матеріалів, створенні лікарських препаратів, каталізі, фотохімії, біологічних системах, проявляють протимікробні властивості в складі терапевтичних засобів [4].

Літературні дані свідчать, що такі елементи в результаті особливостей будови їх внутрішніх електронних оболонок (так звані d^{10} іони), мають ряд загальних специфічних властивостей, а саме: здатність до комплексоутворення, можливість набувати різних ступенів окислення, взаємодіяти з рядом негативно заряджених молекул [5]. З іншого боку серед біополімерів велику наукову привабливість в області медицини, біотехнологій, фармації, косметики має хітозан. Хітозан є полісахаридом, одним з небагатьох природних катіонітів. В своїй структурі він має три типи реактивних функціональних груп, які забезпечують його хімічні взаємодії, а саме: аміногрупи в позиції С-2, а також первинні та вторинні гідроксильні групи в С-6 та С-3 позиціях відповідно. Це надає хітозану таких властивостей, як біосумісність з нативними тканинами макроорганізму, біодеградація, протимікробна активність [6-9].

Глюкозамінні ланки в структурі хітозану є місцями приєднання до його молекулярного ланцюга. Так, в протонованій формі аміногрупи дозволяють приєднання через електростатичну взаємодію, нуклеофільні властивості амінів дозволяють приєднання шляхом ковалентних зв'язків, оскільки аміни мають активну іонну пару електронів на електронегативному атомі азоту. Саме ці електрони приєднуються до позитивно зарядженої частини іншої молекули. З іонами металів хітозан зв'язується через механізми комплексоутворення [10]. На рис. 1 подана структурна хімічна формула двох ланцюгів хітозану (1) та механізм їх «зшивання» двовалентним іоном металу (2).

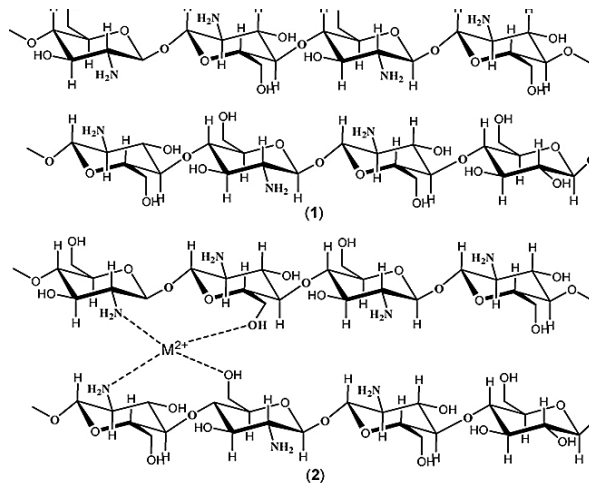


Рис. 1 – Схема утворення комплексу метал-хітозан [11]

Вище наведені властивості хітозану широко використовують на практиці комплексно з факторами росту, антибактеріальними агентами, у складі матеріалів на основі гідроксиапатиту для лікування кісткової тканини [12]. З літературних джерел відомо, що хітозан проявляє протимікробну та фунгіцидну дію щодо широкого спектру мікроорганізмів [13-15].

* l.sukhodub@gmail.com

Крім того, показано, що хелатні комплекси хітозану з іонами металів проявляють більшу протимікробну активність в порівнянні з чистим хітозаном [16, 17].

Метою даної роботи було отримання наночастинок хітозану, легованих іонами металів, та дослідження їх спектральних та протимікробних властивостей з метою подальшого використання в якості компонентів при створенні композиційних біоматеріалів медичного призначення.

Досліджена протимікробна активність іонів Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , та комплексів метал-хітозан з вказаними іонами по відношенню до референтних штабів мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Матеріали

Хітозан (молекулярна маса (М.М.) 500 кДа, ступінь деацетилювання 85 %) виробництва «Біопрогрес», Москва. Поживне середовище Мюллера-Хінтона, м'ясо-пептонний бульон (МПБ) виробництва Махачкалинського заводу поживних середовищ, Росія. Тест-штами мікроорганізмів, (ДУ) Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМНУ, Україна). Хімічні реактиви AgNO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ аналітичного ступеню чистоти.

Культури мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653 були підготовані згідно до нормативних документів [18]. Приготування суспензії мікроорганізмів з концентрацією, яка відповідала 0,5 одиницям оптичної густини за шкалою Mc. Farland, проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробник PLIVA-Lachema, Чехія, довжина хвилі 540 нм) згідно інструкції до приладу та методики [19]. При проведенні досліджень використовували однодобові культури мікроорганізмів.

2.2 Методика отримання зразків

Суспензія наночастинок хітозану, отримана методом іонотропного гелеутворення з використанням натрієвої солі триполіфосфату [20, 21]. Утворення суспензії наночастинок відбувається завдяки взаємодії протилежно заряджених іонів макромолекул хітозану, як полікатиону, та негативно зарядженої молекули натрієвої солі триполіфосфату ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), яка при кислих значеннях ($\text{pH} = 3$) присутня в розчині у вигляді фосфонієвого аніону $\text{P}_3\text{O}_{10}^{-5}$ [22].

Для приготування суспензії наночастинок хітозану (М.М. 500 кДа) до розчину 0,1 мас. % хітозану в 0,15 мас. % оцтової кислоті, отриманого при температурі 37 °С та перемішуванні в шейкері (150 кол./хв.) протягом 3 годин, було додано натрій триполіфосфат, остаточної концентрації якого в робочому розчині складала 0,1 мас. %. Для отримання металовмісних наночастинок хітозану, до отриманої суспензії додавали сполуки металів (AgNO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в кількості, яка відповідала концентрації відповідних металічних іонів 200 ppm (мкг/мл).

Суспензія була піддана дії ультразвуку протягом 10 хвилин та перемішувалась в шейкері (200 кол./хв.) при температурі 37 °С протягом 4 годин. Отримана суспензія була трикратно промита деіонізованою з відокремленням промивної води шляхом центрифугування, частина суміші була ресуспендована в деіонізованій воді, заморожена та ліофільно висушена в вакуумі 0,45 мБар при температурі 180 °С для подальших інструментальних досліджень. Додатково були приготовані водні розчини вище вказаних сполук металів з концентрацією 1000 ppm для порівняльного експерименту.

2.3 Інструментальні методи

2.3.1 Просвічуюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження структури і фазового складу зразків проводилось з використанням просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К при роботі у світлопольному та мікродифракційному режимі без введеної селекторної діафрагми. Прискорююча напруга складала 90 кВ. При роботі у режимі мікродифракції дифракційна картина отримувалась від вибраної, незначної за розміром ділянки зразка, площа якої менша, ніж при звичайній дифракції. Цей метод дозволяє отримати результати з малої площі зразка, що важливо при дослідженні мікроструктури та багатофазних зразків.

Для розміщення об'єктів у предметній площині об'єктивної лінзи ПЕМ використовувались опорні сітки з міді (30×30 мкм) та нікелю (50×50 мкм). Оскільки об'єкти мали розміри менші за отвори сітки, вони розміщувались на тонких, прозорих для електронів, суцільних плівках вуглецю товщиною 20 нм. Зразки розчину комерційного порошку хітозану в оцтовій кислоті, суспензії наночастинок хітозану та суспензії наночастинок хітозану, легованих іонами металів, наносились на опорну сітку з плівкою вуглецю методом ультразвукової диспергації.

2.3.2 Рентгено-флуорисцентний аналіз

Рентгено-флуорисцентний аналіз (РФА) є одним із методів, який широко застосовується для аналізу елементного складу біологічних зразків в широкому діапазоні концентрацій. В даній роботі був використаний спектрометр нового покоління «ElvaX-Light SDD» (Україна, Київ), який дозволяє визначати хімічні елементи в діапазоні від Na ($Z = 11$) до U ($Z = 92$). Технічні характеристики приладу: рентгенівська трубка з Rh-анодом, берилієве вікно 140 мкм, роздільна здатність рентгенівського детектора 165 eВ при 5,9 keВ (смуга Mn K α). Рентгенограми отримували з використанням алюмінієвого фільтра протягом $120 \div 180$ с.

2.3.3 ІЧ спектроскопія

Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США), в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу. Промені від ІЧ-джерела світла проходять через зразок і

падають на детектор, який вимірює поглинання світла зразком. Величина поглинання дозволяє точно ідентифікувати молекулярну структуру зразка та визначити кількість речовини в суміші.

2.4 Оцінка протимікробної активності *in vitro*

Вивчення чутливості мікроорганізмів проводили методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі. Для отримання вихідного розчину суспензію наночастинок чистого хітозану, наночастинок хітозану, легованих іонами металів та водні розчини сполук металів додавали до пробірок з МПБ з розрахунку 1 мл:1 мл. В якості контрольного зразка брали розчин оцтової кислоти з концентрацією 1 мас. %.

В пробірках готували ряд двократних розведень препарату в 2 мл суспензії. Після цього в кожному пробірці, в тому числі і контрольному, вносили по 0,2 мл мікробної зависі тест-штаму. Мікробне навантаження становило 10^7 колонієутворюючих одиниць на мілілітр (КУО/мл). Посіви вміщували в термостат, а результати визначали візуально за наявністю або відсутністю каламутності середовища в пробірках. Концентрація препарату в останній пробірці з прозорим середовищем (відсутність видимого неозброєним оком росту тест-штаму) відповідає мінімальній інгібуючій концентрації препарату (МІК).

Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) з 2-3 останніх пробірок з прозорим середовищем проводили висів 0,1 мл вмісту з кожної пробірки на чашки з твердим поживним середовищем. Витримували в термостаті 18 ± 24 години при 37°C і відмічали ту мінімальну концентрацію препарату, висів з якої не давав росту на агарі. Дана кількість препарату відповідає його МБЦК. Метод серійних розведень у рідких поживних середовищах дозволяє дати кількісну оцінку протимікробної активності.

Обробку результатів експериментів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003. Для порівняння відмінностей дослідних груп з контрольною використовували однофакторний дисперсійний аналіз і критерій Даннета.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Наночастинок хітозану та їх характеристика

Дослідження показали, що додавання натрію триполіфосфату до розчину хітозану призводить до утворення суспензії наночастинок хітозану з середнім розміром 30 нм (рис. 2). Додавання до реакційної суміші іонів металів призводить до збільшення густини та кількості утвореної суспензії наночастинок. На рис. 3 показана мікрофотографія наночастинок хітозану, легованих іонами срібла, середній розмір яких становить 25 нм.

Порівняння електроннографічних знімків розчину нітрату срібла та суспензії наночастинок хітозану, утворених з додаванням вказаного розчину при синтезі, підтверджує входження іонів срібла до структури наночастинок (рис. 4).

РФА аналіз досліджуваних зразків підтверджує включення іонів металів в структуру хітозану. На

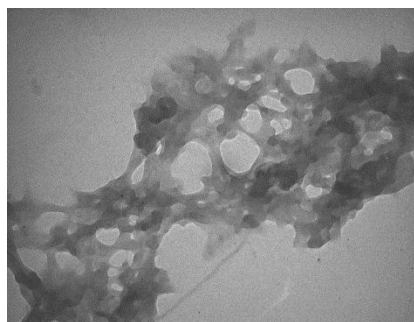


Рис. 2 – Наночастинок хітозану

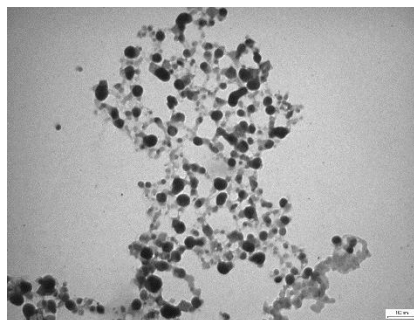
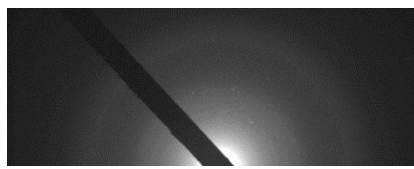


Рис. 3 – Наночастинок хітозану, легованих іонами срібла



а



б

Рис. 4 – Електроннограма розчину нітрату срібла (а) та наночастинок хітозану, легованих іонами срібла (б)

рис. 5 показано РФА спектри наночастинок хітозану, легованих іонами срібла (а), міді (б) та цинку (в). Аналогічні спектри були отримані для наночастинок хітозану, легованих іонами заліза та магнію. Найбільш інтенсивні піки належать іонам відповідних металів, що підтверджує їх входження до структури отриманих комплексів.

ІЧ спектроскопія зразків порошкоподібного хітозану (а) та ліофілізованих суспензій наночастинок хітозану (б), суспензій наночастинок хітозану, легованих іонами цинку (в), (рис. 6), демонструє присутність у всіх зразках піків, характерних для хітозану, а саме: коливань зв'язку С-Н в області $2857\text{-}2867\text{ cm}^{-1}$, ряду типових для хітозану коливань в області $625\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

В той же час коливання в спектрі хітозану (а) вторинних ОН- груп [23] (1161 cm^{-1}) зміщені в бік вищих частот у спектрі наночастинок хітозану

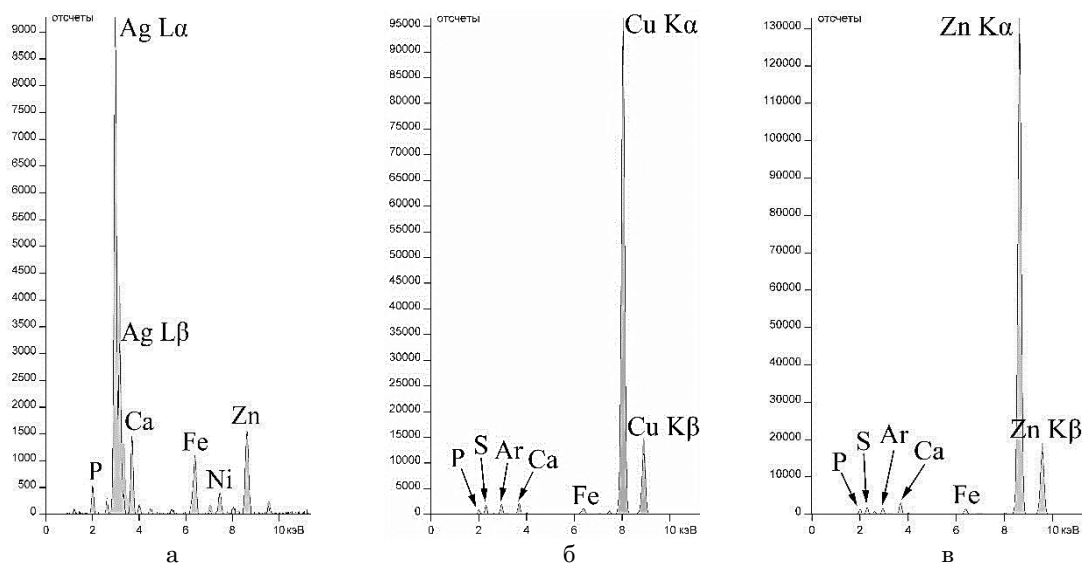


Рис. 5 – РФА спектр наночастинок хітозану, легованих іонами срібла (а), міді (б) та цинку (в)

(1151 cm^{-1}), наночастинок хітозану, легованих іонами срібла (1146 cm^{-1}). Ці відмінності у спектрах свідчать про участь гідроксильних груп хітозану у зв'язках з іонами оточення. Широка смуга коливань OH^- та аміногруп з піком 3429 cm^{-1} у спектрі хітозану (а) не спостерігається для всіх інших спектрів.

Натомість, у всіх спектрах наночастинок хітозану (б-в) з'явилися широкі смуги коливань з максимумом в області $3144\text{--}3246\text{ cm}^{-1}$. Такий зсув в бік високих частот може бути індикатором адсорбції хітозаном присутніх у розчині іонів металів [24]. Деформаційне коливання аміно-групи NH_2 в спектрі хітозану (а) в області 1598 cm^{-1} є зміщеним в область більших частот у всіх інших спектрах, як результат ефектів координації та водневих зв'язків.

Характерний для хітозану пік Амід I (1651 cm^{-1}) [25, 26] є зміщеним до 1638 cm^{-1} для наночастинок хітозану (б), до 1641 cm^{-1} для наночастинок з сріблом (в), до 1640 cm^{-1} для наночастинок з міддю та залізом, до 1627 cm^{-1} для наночастинок з магнієм, до 1629 cm^{-1} для наночастинок з цинком. На відміну від хітозану (а), у всіх інших спектрах з'явився новий гострий пік в області $1017\text{--}1022\text{ cm}^{-1}$, та пік в області $1058\text{--}1061\text{ cm}^{-1}$, які належать валентним коливанням С-О та коливанням С-О-Р-, спричиненим присутністю фосфонієвого аніону $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ [27].

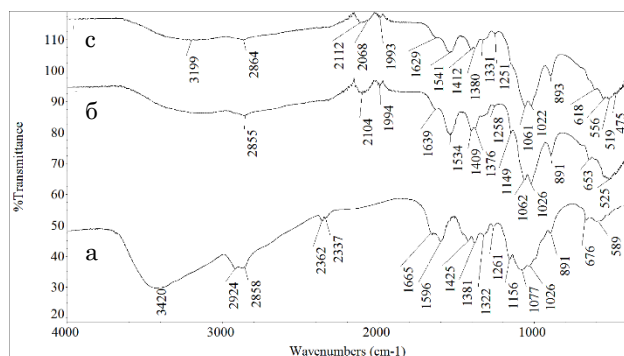


Рис. 6 – ІЧ спектри порошку комерційного хітозану (а); ліофілізованих наночастинок хітозану (б); ліофілізованих наночастинок хітозану, легованих іонами цинку (в)

Наведені факти свідчать як про структурні зміни в молекулі хітозану після іонного гелеутворення, так і про участь функціональних груп у комплексоутворенні з іонами металів. Також з'явилися нові піки для наночастинок, легованих іонами металів, а саме: 826 cm^{-1} для срібла (в), 441 cm^{-1} для міді, 501 cm^{-1} для магнію, 475 cm^{-1} для цинку, 473 cm^{-1} для заліза, які відповідають коливанням зв'язку іон металу-азот (M-N) [28, 29].

3.2 Протимікробна активність

В результаті досліджень було визначено МІК та МБЦК наночастинок хітозану, а також наночастинок хітозану, легованих іонами срібла, міді, цинку, магнію та заліза. Було також визначено МІК та МБЦК розчину оцтової кислоти з концентрацією 1 мас. %, яка є розчинником хітозану. Для порівняння протимікробної активності іонів металів без хітозану було приготовано розчини сполук вище вказаних металів з концентрацією відповідних металічних іонів 1000 ppm та визначено їх МІК та МБЦК.

Наночастинки як чистого хітозану, так і леговані металічними іонами показали більшу протимікробну активність порівняно з контролем (1 мас. % оцтова кислота), що є фактом протимікробної активності досліджуваного матеріалу, а не розчинника. У більшості випадків суспензії наночастинок, легованих іонами металів, проявляли сильнішу протимікробну дію, ніж суспензії наночастинок чистого хітозану і значно перевищували протимікробну активність відповідних іонів металів. Найбільш чутливим до всіх досліджуваних зразків виявився грам негативний мікроорганізм *E. coli* ATCC 25922, а найменш вразливим – гриби *C. albicans* ATCC 885653. Найбільшу протимікробну активність проявили наночастинки хітозану, леговані іонами Ag^+ . Їх МІК в порівнянні з МІК наночастинок чистого хітозану для *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* знижується в 8, 4, та 2 рази відповідно, а в порівнянні з МІК іону Ag^+ – в 5, 40 та 10 разів відповідно.

Значне збільшення протимікробної активності характерне для всіх інших наночастинок хітозану, легованих іонами металів з в порівнянні з активністю самих металічних іонів. Отримані результати не суперечать літературним даним [30] та пояснюються тим, що хітозан в розчині оцтової кислоти набуває позитивного заряду за рахунок протонування аміногрупи NH_2 , яка є функціональною групою глюкозамінної ланки хімічного ланцюга його молекули: $\text{R-NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-NH}_3^+$. Позитивно заряджені групи хітозану, приєднуючись до негативно зарядженої поверхні мікробної клітини, порушують її метаболізм [31]. Очевидно, що іони металів, додані до розчину хітозану, «зшивають» його молекули та роблять структуру більш щільною, в результаті чого збільшується ефект протимікробної дії.

4. ВИСНОВКИ

1. Електронно-мікроскопічні дослідження структури і фазового складу зразків підтвердили, що в результаті застосування методу іонотропного гелеутворення з використанням підібраної концентрації реагентів утворюється суспензія наночастинок хітозану з середнім розміром частинок 30 нм.

2. Рентгенофлуорисцентний аналіз досліджуваних зразків підтверджує включення іонів металів Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} в структуру хітозану.

3. ІЧ спектроскопія зразків порошкоподібного хітозану та ліофілізованих суспензій наночастинок хітозану, суспензій наночастинок хітозану, легованих іонами металів свідчать як про структурні зміни в молекулі хітозану після іонного гелеутворення, так і про участь його функціональних груп у комплексо-

утворенні з іонами металів.

4. Дослідження *in vitro* протимікробної активності показало, що у більшості випадків суспензії наночастинок, легованих іонами металів, проявляли сильнішу протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану і значно перевищували протимікробну активність відповідних іонів металів. Найбільш чутливим до всіх досліджуваних зразків виявився грам негативний мікроорганізм *E. coli* ATCC 25922, а найменш вразливим – гриби *S. Albicans* ATCC 885653. Найбільшу протимікробну активність проявили наночастинок хітозану, легованих іонами Ag^+ . Їх МІК в порівнянні з МІК наночастинок чистого хітозану для *E. coli*, *S. aureus*, *S. Albicans* знизилася в 8, 4, та 2 рази відповідно, а в порівнянні з МІК іону Ag^+ – в 5, 40 та 10 разів відповідно.

5. Результати даного дослідження свідчать про перспективність застосування наночастинок хітозану, легованих іонами Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , в якості протимікробної складової для композитних матеріалів медичного призначення.

ПОДЯКА

Автор висловлює подяку к.б.н., ст.н.співр. ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ» Шульзі Н.М. за допомогу у проведенні мікробіологічних досліджень та ціну дискусію, Кузнецову В.М. за проведення РФА та технічну допомогу, Воробйову С. за електронно-мікроскопічні дослідження, лабораторії «Біонанокомпозит» Сумського державного університету МОН України за надану можливість синтезу зразків.

Наночастицы хитозана, модифицированные ионами металлов

Л.Б. Суходуб

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМНУ»,
ул. Пушкинская, 14, Харьков, Украина

Микроэлементы в организме человека, присутствующие в следовых количествах ("trace elements") играют существенную роль в регуляции клеточных функций, активируют или ингибируют ферментативные процессы. Модификация неорганическими биоактивными ионами материалов для ортопедических имплантатов с целью иницирования контролируемых реакций в тканях, окружающих имплантат, является одним из современных подходов в медицинском материаловедении. Основным заданием данной работы было получение наночастичек хитозана, легированных ионами металлов Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} наночастичек хитозана, исследование их противомикробных свойств по отношению к референтным штаммам микроорганизмов *S. Aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. Albicans* ATCC 885653 с целью дальнейшего использования в качестве компонентов при создании биоматериалов медицинского назначения.

Ключевые слова: Наночастички, Ионы металлов, Хитозан, Микроорганизмы, Антимикробные свойства.

Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles

L.B. Sukhodub

Government Agency "Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", 14-Puschinskaya Str., 61057 Kharkov, Ukraine

Microelements in human body which are presented in trace quantities ("trace elements") play essential role in the regulation of cellular functions, activate or inhibit the enzymatic processes. Modification of bioactive materials for orthopedic implants by inorganic ions to initiate controlled reactions in the tissue surrounding the implant is one of the modern approaches in medical research. The tasks of this work included the obtaining of Chitosan nanoparticles, metal ions Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} doped Chitosan nanoparticles, investigation of their antimicrobial properties to the reference microorganisms *S. Aureus* ATCC 25923, *E. Coli* ATCC 25922, *C. Albicans* ATCC 653885 for further use as components in creating composite biomaterials for medical purposes.

Keywords: Nanoparticles, Metal ions, Chitosan, Microorganisms, Antimicrobial properties.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Биоматериалы и биоминерализация* (Ред. В.Ф. Пичугин, Ю.П. Шаркеев, И.А. Хлусов) (Томск: Ветер: 2007).
2. М.В. Погорелов, В.І. Бумейстер, В.Ф. Ткач, В.З. Сікора, Л.Ф. Суходуб, С.М. Данільченко *Макро- та мікроелементи (обмін, патологія та методи визначення)* (Суми: Сумський державний університет: 2010).
3. Claus Moseke, *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 1654 (2013).
4. Muhammad Imran, Sumaira Nazir, Shoomaila Latif, Zaid Mahmood, *J. Chem. Soc. Pak.* No 4, 492 (2010).
5. A.A. Warra, *J. Chem. Pharm. Res.* **3** No 4, 951 (2011).
6. Daniela Enescu, Camella Elena Olteanu, *Chem. Eng. Comm.* **195**, 1269 (2008).
7. F. Nejati Hafdani, N. Sadeghinia, *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **74**, 257 (2011).
8. Lei Song, Lu Gan, Yan-Feng Xiao, Yao Wu, Fang Wu, Zhong-Wei Gu, *Mater. Lett.* **65**, 974 (2011).
9. E.M. Costa, S. Silva, F.K. Tavarina, M.M. Pintado, *Anaerobe* **20**, 27 (2013).
10. Hans-Jörg Schneider, Kazuaki Kato, Robert M. Strongin, *Sensors* **7**, 1578 (2007).
11. Arh-Hwang Chen, Cheng-Yu Yang, Chia-Yun Chen, Chia-Yuan Chen, Chia-Wen Chen, *J. Hazard. Mater.* **163**, 1068 (2009).
12. A.A. Yanovska, A.S. Stanislavov, L.B. Sukhodub, V.N. Kuznetsov, V.Yu. Illiashenko, S.N. Danilchenko, L.F. Sukhodub, *Mater. Sci. Eng. C* **36**, 215 (2014).
13. Л.Б. Суходуб, Л.Б. А.Ю. Волянський, Л.Ф. Суходуб, Б.І. Гушилик, І.Г. Гайдучок, В.В. Казмірчук, Н.М. Шульга, І.В. Поволокіна, А.В. Парусов, *Аналі Мечніковського Інст.* № 4, 252 (2011).
14. Miao-Miao Lou, Bo Zhu, Ibrahim Muhammada, Bin Li, Guan-Lin Xie, Yan-Li Wangb, Hong-Ye Li, Guo-Chang Sun, *Carbohydrate Res.* **346**, 1294 (2011).
15. Ming Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing, Hyun-Jin Park, *Int. J. Food Microbiology* **144**, 51 (2010).
16. Xiaohui Wang, Yumin Du, Hui Liu, *Carbohydrate Polym.* **56**, 21 (2004).
17. Asha Higazy, Mohamed Hashem, Ali ElShafei, Nihal Shaker, Marwa Abdel Hady, *Carbohydrate Polym.* **79**, 867 (2010).
18. *Бактеріологічний контроль поживних середовищ* (інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670), (Київ: 2000).
19. *Стандартизація приготування мікробних суспензій* (інформаційний лист МОЗ України № 163), (Київ: 2006).
20. Eric Guiba, *Separat. Purific. Technol.* **38**, 43 (2004).
21. T. López-León, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, *J. Colloid Interface Sci.* **283**, 344 (2005).
22. А.В. Ильина, В.П. Варламов, Ю.А. Ермаков, *ДАН* **421** № 2, 199 (2008).
23. Xiaohui Wang, Yumin Du, Hui Liu, *Carbohydrate Polym.* **56**, 21 (2004).
24. G.N. Kousalyaa, Muniyappan Rajiv Gandhib, C. Sairam Sundaramc, S Meenakshib, *Carbohydrate Polym.* **82**, 594 (2010).
25. C. Qin, L. Xiao, Y. Du, X. Shi, J. Cheng, *Reactive Functional Polym.* **50**, 165 (2002).
26. R. Molinaa, P. Jovancicb, S. Vilcheza, T. Tzanovc, C. Solansa, *Carbohydrate Polym.* **103**, 472 (2014).
27. A. Sinha, S. Nayar, *J. Am. Ceram. Soc.* **86** No 2, 357 (2003).
28. Kazuo Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Application in Coordination, Organometallic, and Bioorganic Chemistry* (John Wiley & Sons: 2012).
29. L.G. Tang, N.S. Hon David, *J. Appl. Polymer Sci.* **79**, 1476 (2001).
30. Wen-Li Du, Shan-Shan Niu, Ying-Lei Xu, Zi-Rong Xu, Cheng-Li Fan, *Carbohydrate Polym.* **75**, 385 (2009).
31. A.K. Singla, M. Chawla *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1047 (2001).